



TITLE:

ナイミーヘン症候群の原因遺伝子  
NBS1の放射線とアフラトキシンに  
対する細胞応答における役割(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

周, 慧

---

CITATION:

周, 慧. ナイミーヘン症候群の原因遺伝子NBS1の放射線とアフラトキシンに対する細胞応答における役割. 京都大学, 2017, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20659>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要旨は2017-10-01に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博 士 ( 理 学 )	氏名	周 慧
論文題目	ナイミーヘン症候群の原因遺伝子 <i>NBS1</i> の放射線とアフラトキシンに対する細胞応答における役割		
(論文内容の要旨)			
<p>ナイミーヘン症候群の原因遺伝子産物<i>NBS1</i>は細胞周期チェックポイントの制御および相同組換え (HR) 修復に機能することで、放射線誘発DNA損傷応答に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、<i>NBS1</i>の制御機構には不明な点が多い。さらに、<i>NBS1</i>は紫外線誘発DNA損傷発生時に損傷乗り越えDNA合成 (TLS) に機能することが報告されている。このように<i>NBS1</i>は放射線誘発DNA損傷に限らず様々なDNA損傷に応答する多機能タンパク質だと考えられ、未解明な機能が残されていることが推測される。そのため本研究は、<i>NBS1</i>の放射線誘発DNA損傷応答における<i>NBS1</i>の制御機構とともに、アフラトキシン<i>B</i><sub>1</sub> (AF<i>B</i><sub>1</sub>) 誘発DNA損傷応答における<i>NBS1</i>の役割についても明らかにすることを目的とした。</p> <p><i>NBS1</i>はMRE11、RAD50とMRN複合体を形成して放射線誘発DNA損傷応答に機能する。最初に免疫沈降法を用いてMRN複合体形成を検討すると、抗MRE11抗体で共沈する<i>NBS1</i>の量が放射線照射により増加した。<i>NBS1</i>はATMキナーゼによってリン酸化を受けるが、ATMによる<i>NBS1</i>のリン酸化部位をアラニンに置換した場合およびATM特異的阻害剤で前処理した場合、ともにMRE11と共沈する<i>NBS1</i>タンパク質量の増加が見られなくなった。このことから、放射線誘発二本鎖切断 (DSB) 発生時に<i>NBS1</i>がATMによりリン酸化されることでMRN複合体形成が促進されたと考えられた。また、リン酸化部位に変異を加えた<i>NBS1</i>発現細胞の細胞周期解析から、このようなATM依存的なリン酸化は細胞周期チェックポイント制御に重要であることが示唆された。細胞をG0期で停止させるとMRE11、RAD50に変化は見られなかったが、<i>NBS1</i>タンパク質量が顕著に減少した。このG0期での停止細胞をGFPレポーターアッセイで解析するとHR修復活性が低下していた。この結果は<i>NBS1</i>タンパク質の量的制御はDNA合成が完了して相同な姉妹染色分体が存在する前に、突発的にHR修復機構が活性化して、非相同な染色体間での組換えが起こることを防ぐのに重要であると考えられる。</p> <p>代謝酵素<i>CYP1A2</i>遺伝子を導入した細胞にAF<i>B</i><sub>1</sub>処理を行うと細胞死を増加させた。またAF<i>B</i><sub>1</sub>処理はPCNAのモノユビキチン化およびPol ηのフォーカス形成を誘導することから、Pol η依存性TLS経路の活性化が示唆された。次に、<i>NBS1</i>およびRAD18の関与を検討したところ、<i>NBS1</i>あるいはRAD18欠損細胞ではPCNAのモノユビキチン化が消失するとともに、AF<i>B</i><sub>1</sub>に対する致死感受性が増加した。これらの結果から<i>NBS1</i>とRAD18を介したPol η依存的なTLS経路が活性化されることで、細胞内で活性化されたAF<i>B</i><sub>1</sub>により生じたDNA損傷が引き起こす細胞死が抑制されることが示唆される。</p> <p>本研究はATM依存的なMRN複合体形成の促進と細胞周期依存的タンパク質の量的制御という<i>NBS1</i>の二つの制御機構を明らかにした。またAF<i>B</i><sub>1</sub>誘発DNA損傷の発生時に<i>NBS1</i>がTLSに機能することを明らかにした。このように、<i>NBS1</i>はゲノム安定化と細胞死の低減に重要な役割をしていることが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子情報を担うDNAは日常的に多くの変異原にさらされている。生物は遺伝情報を正確に保つために、DNA修復機構のみならず、修復期間中は細胞増殖を停止させるなどのDNA損傷応答機構を進化させてきた。このような機構が破綻すると、がんをはじめとする様々な疾患が引き起こされる。ナイミーヘン症候群はNBS1タンパク質の異常によって引き起こされるヒト常染色体劣性遺伝病であり、放射線高感受性ととも複合型免疫不全や高発がん性などの臨床症状を呈する。このようなNBS1タンパク質の研究は、がんをはじめとする様々な疾病の発症メカニズムの解明や医療応用といった医学的観点だけではなく、DNA損傷修復のメカニズムを解明する生物学的観点からも非常に重要である。

これまで、NBS1はDNA修復、細胞増殖停止、損傷乗り越えDNA合成(TLS)の制御などにおいて機能し、放射線や紫外線誘発DNA損傷に防御的にはたらくことが示されている。本申請論文では、ヒトおよびマウス培養細胞を用いて、NBS1タンパク質の放射線応答の制御機構並びに、既に知られている放射線や紫外線以外のゲノムストレスに対する役割の解明を目指した。

NBS1タンパク質は、損傷のタイプに応じて結合する修復因子を変え、適切な修復機構によって損傷応答機構をうまく連携させていると推測される。しかし、NBS1を制御するメカニズムは十分には解明されていなかった。申請者は、放射線照射後にATMがNBS1タンパク質をリン酸化することにより、MRE11およびRAD50タンパク質との複合体形成を促進し、この複合体形成が細胞増殖の停止において重要であることを明らかにした。さらに、細胞周期依存的にNBS1タンパク質の発現量が制御されることを発見した。このことは、姉妹染色体が存在しない細胞周期で、NBS1タンパク質量の低下が非相同な染色体間で組換え機構が活性化するのを防ぐために役立っていると考えられる。これらのいずれの結果も、NBS1タンパク質がゲノム安定化の維持にはたらくことを示している。

NBS1は放射線誘発DNA損傷応答に機能するタンパク質として知られてきた。申請論文では、NBS1が自然環境に存在するカビ毒アフラトキシンB<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)によるDNA損傷応答時にも機能することを示した。AFB<sub>1</sub>は強力ながん誘発物質であるが、そのがん誘発メカニズムの詳細は明らかになっていない。これまで、哺乳動物においては、AFB<sub>1</sub>誘発DNA損傷応答にヌクレオチド除去修復機構と塩基除去修復機構が関与することが報告されていたが、申請者はAFB<sub>1</sub>誘発DNA損傷がNBS1、RAD18およびPol η依存的にTLSを活性化することを明らかにした。誤りをともないがちなTLSを行うことは突然変異率の上昇につながるため、本研究の結果はAFB<sub>1</sub>の発がんメカニズムを明らかにするための重要な知見と考えられる。またアフラトキシンをはじめとする環境変異原による汚染は、発展途上国の食品衛生に深刻な脅威となっている。本研究の結果は他の環境変異原による生体影響のメカニズム解明にも貢献すると考えられる。

申請者の研究は、DNA修復因子NBS1の制御と機能解明に貢献するものであり、学術的に非常に価値のあるものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年7月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。